

- JAHN, S.; R. GRUNOW; S. T. KIESSIG; U. SPECHT; H. MATTHES; F. HIEPE; A. HLINAK y R. VON BAEHR (1987a). *Establishment of Human Ig Producing Heterohybridomas by Fusion of Mouse Myeloma Cells with Human Lymphocytes Derived from Peripheral Blood, Bone Marrow, Spleen, Lymph Node, and Synovial Fluid*. J. Immunol. Meth. (en prensa).
- KOZBOR, D. y L. RODER (1981). *Requirements for the Establishment of High-titred Human Monoclonal Antibodies Against Tetanus Toxoid using Epstein-Barr Virus Technique*. Immunobiol. 159: 67-72.
- OSTBERG, L. y E. PURSCH (1983). *Human x (Mouse x Human) Hybridomas Stably Producing Human Antibodies*. Hybridoma 2: 361-365.

Roland Grunow, Siegbert Jahn y Rudiger von Baehr
Institute for Medical Immunology
Department of Medicine (Charité) of the
Humboldt University, Berlin, GDR

* * *

Hibridomas contra la toxina tetánica, construidos con linfocitos humanos tomados de donantes a diferentes tiempos después del Booster in vivo

Al editor:

En un estudio reciente describimos el desarrollo de una línea celular (CB-F7) con alta efectividad como pareja de fusión para la creación de hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales humanos (AcMh). Esta línea, derivada de un clon heterohíbrido producido en una fusión humano-ratón, es sensible al HAT, resistente a la ouabaina y no secreta inmunoglobulinas propias; con ella es posible producir hibridomas humano x (humano-ratón) estables en su secreción de inmunoglobulinas específicas (Grunow *et al.*, 1987).

A pesar de que la alta eficiencia de generación de híbridos que exhibe esta línea luego de la fusión (hasta un híbrido por cada 50 000 linfocitos humanos), viene a resolver uno de los problemas fundamentales que limitan en la actualidad la producción de AcMh, en los experimentos mencionados la proporción de hibridomas específicos luego de las fusiones fue muy baja.

Esta situación puede ser resuelta, al menos, por tres vías: 1) mediante el enriquecimiento de las células precursoras específicas, por métodos de separación ("panning", FACS) o cultivo transitorio (luego de la transformación con el virus de Epstein-Barr); 2) mediante el uso de técnicas de inmunización *in vitro* o protocolos de pre-estimulación *in vitro*, y 3) mediante la inmunización booster de donantes de sangre (si fuera posible para el antígeno en cuestión).

Como nosotros no hemos podido desarrollar una forma efectiva y repetible para la inmunización *in vitro* de linfocitos humanos (Jahn *et al.*, 1987), y tampoco encontramos influencias beneficiosas de la estimulación policlonal de los linfocitos sobre los resultados de fusión (Jahn *et al.*, 1987a), decidimos ensayar el aspecto 3) para la obtención de hibridomas con especificidad antigénica contra la toxina tetánica (TT).

En algunos estudios de regulación *in vitro* nosotros pudimos demostrar una dependencia de la secreción de anticuerpos específicos por los linfocitos en cultivo, a diferentes tiempos luego

de una inmunización secundaria (*booster*) *in vivo* de donantes (Jahn *et al.*, 1987); cuando los linfocitos derivados de diferentes voluntarios que no habían sido reinmunizados por al menos seis meses, se fundieron con la línea CB-F7 sólo pudimos encontrar hibridomas secretores de anticuerpos del tipo IgM, específicos para la TT (tabla 1). Estos donantes producían mayormente anticuerpos IgM de una variada multiespecificidad (reaccionando con autoantígenos y aloantígenos) y de muy baja afinidad (Jahn *et al.*, 1986), sin capacidad protectora en ratones.

Tabla 1
HIBRIDOMAS HUMANOS PRODUCTORES DE ANTICUERPOS ANTITOXINA TETANICA,
CONSTRUIDOS CON LINFOCITOS HUMANOS TOMADOS DE DONANTES
A DIFERENTES TIEMPOS, LUEGO DEL BOOSTER *IN VIVO*

Días después del booster	Número de fusiones	Pozos sembrados	IgG	IgM	aTT _G	aTT _M
antes	40	14 080	1 013	10 204	0	284
3	4	1 454	210	946	6	60
7	4	1 719	376	1 328	162	38
14	4	974	124	798	8	24

Nota: aTT_G = anticuerpos anti TT del tipo IgG; aTT_M = anticuerpos anti TT del tipo IgM.

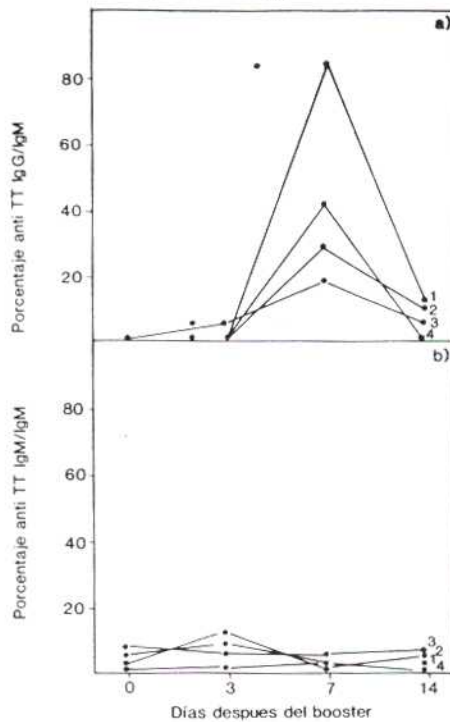


FIG. 1. Proporciones de hibridomas productores de anticuerpos anti TT de las clases (a) IgG y (b) IgM, en fusiones realizadas a diferentes tiempos luego del *booster in vivo*. Abscisa a) tanto por ciento de hibridomas secretores de anticuerpos específicos anti TT, del tipo IgG, con respecto a todos los hibridomas secretores de IgG; abscisa b) tanto por ciento de hibridomas secretores de anticuerpos específicos anti TT, del tipo IgM, con respecto a todos los hibridomas secretores de IgM. Ordenada: días después del *booster*.

Para definir los principios de formación de hibridomas productores de IgM e IgG contra la TT, nosotros estudiamos cuatro donantes de manera sistemática. La sangre venosa se obtuvo antes, y 3, 7 o 14 días después de un *booster in vivo*. Los linfocitos de sangre periférica sin separar se hibridizaron con las células CB-F7 en una relación 4:1, empleando un protocolo estándar de fusión mediada por polietilenglicol. En el tamizaje de inmunoglobulinas y anticuerpos específicos se emplearon sistemas tipo ELISA (Jahn *et al.*, 1986a).

Tres días después del *booster*, solo en una de cuatro fusiones se produjeron hibridomas secretores de IgG anti TT, mientras que se observó un ligero aumento en los secretores de IgM (figura 1). En cambio, 7 días después de la reinmunización, un gran número de los hibridomas secretores de IgG producían anticuerpos contra la TT. Más aún, en estas fusiones se encontró una disminución de los anticuerpos específicos tipo IgM. En los experimentos conducidos con los linfocitos provenientes de donantes sometidos a un *booster* dos semanas antes, el rendimiento de hibridomas productores de IgG anti TT disminuyó.

De estas fusiones se ha obtenido un panel de hibridomas humanos productores de anticuerpos IgG anti TT, que se ensayan en la actualidad en ratones para su capacidad neutralizante.

Nuestros resultados demuestran que el conocimiento del proceso *in vivo* luego de la inmunización secundaria en el hombre, es de suma importancia para el desarrollo de AcMh. Esta experiencia realizada en el modelo de la producción de anticuerpos anti TT será aplicada a otros antígenos.

REFERENCIAS

- GRUNOW, R.; S. JAHN; T. PORSTMANN; S. T. KIESSIG; H. STEIN-KELLNER; F. STEINDL; L. GÜRTLER; F. DEINHARDT; H. KÄTINGER y R. VON BAEHR (1987). *A High Efficient Human B Cell Immortalizing Heteromyeloma CB-F7. Production of Human Monoclonal Antibodies to Human Immunodeficiency Virus*. J. Immunol. Meth. (en prensa).
- JAHN, S.; S. T. KIESSIG; R. GRUNOW; T. PORSTMANN y R. VON BAEHR (1986). *Monoclonal Human Natural Antibodies with Widespread Antigen Specificities*. Abstracts Sixth International Congress on Immunology, Toronto, Canada, 1986 No. 3: 73-75.
- JAHN, S.; S. T. KIESSIG; A. LUKOWSKY; H. D. VOLK; T. PORSTMANN; R. GRUNOW y R. VON BAEHR (1986a). *Pokeweed Mitogen Induced Synthesis of Human IgG and IgM In Vitro. Technical Aspects and the Role of Adherent Cells*. Biomed. Biochem. Acta 45: 467-476.
- JAHN, S.; S. T. KIESSIG; R. GRUNOW; R. VON BAEHR (1987). *In Vitro Immunization for Antibody Production Against Tetanus Toxoid and Toxin*. Allergie Immunol. 45: 46-49.
- JAHN, S.; R. GRUNOW; S. T. KIESSIG; U. SPECHT; H. MATTHES; F. HIEPE; A. HLINAK y R. VON BAEHR (1987a). *Establishment of Human Ig Producing Heterohybridomas by Fusion of Mouse Myeloma Cells with Human Lymphocytes Derived from Peripheral Blood, Bone Marrow, Spleen, Lymph Node, and Synovial Fluid*. J. Immunol. Meth. (en prensa).

Siegbert Jahn, Roland Grunow, Michael Mehl,
Stephan Kiessig y Rudiger von Baehr
Institute for Medical Immunology, Department
of Medicine (Charité) of the Humbolt University,
Berlin, GDR

* * *